

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
31. August 2006 (31.08.2006)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2006/089762 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:
C12Q 1/68 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2006/001701

(22) Internationales Anmeldedatum:
24. Februar 2006 (24.02.2006)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2005 008 583.0
24. Februar 2005 (24.02.2005) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): JOHANNES GUTENBERG-UNIVERSITÄT
MAINZ (DE/DE); Saarstrasse 21, 55122 Mainz (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BENDER, Klaus
(DE/DE); Schubertstrasse 33, 55271 Siodecken-Elsheim
(DE).

(74) Anwälte: KRAUSS, Jan, B. usw.; Bochnert & Bochnert,
Pettenkoferstrasse 20-22, 80336 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben,
für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,

AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV,
LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,
SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,
TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,
NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen
eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes
and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR TYPING AN INDIVIDUAL USING SHORT TANDEM REPEAT (STR) LOCI OF THE GENOMIC
DNA

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR TYPISIERUNG EINES INDIVIDUUMS MITTELS SHORT TANDEM REPEAT (STR)-
LOCI DER GENOMISCHEN DNA

(57) Abstract: The invention relates to a novel STR typing strategy, which permits the simultaneous amplification and subsequent
analysis of several (e.g. eleven) polymorphic systems with amplicon sizes of less than 270 bp. According to said method, after PCR
amplification, the multiplex reaction is divided into two sets of STR multiplexes and is analysed separately. Said multiplex system
was developed and tested specifically for use in forensic investigation, when only restricted quantities of DNA or badly decomposed
DNA can be obtained, e.g. when isolated from telogen hair roots.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft eine neue STR Typisierungsstrategie, die die gleichzeitige Amplifi-
kation und anschließende Analyse von mehreren (z.B. elf) polymorphen Systemen mit Amplikongrößen von weniger als 270 bp
ermöglicht. Dabei wird nach PCR Amplifikation die Multiplexreaktion in zwei Sets von STR Multiplexen aufgeteilt und getrennt
analysiert. Dieses Multiplexsystem wurde speziell für die Verwendung in forensischer Ermittlungsarbeit entwickelt und getestet,
wenn nur begrenzte Mengen oder stark degradierte DNA erhältlich ist, zum Beispiel, wenn aus Telogenhaarwurzeln isoliert.

WO 2006/089762 A1

Verfahren zur Typisierung eines Individuums mittels short tandem repeat (STR)-Loci der genomischen DNA

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft eine neue STR Typisierungsstrategie, die die gleichzeitige Amplifikation und anschließende Analyse von mehreren (z.B. elf) polymorphen Systemen mit Amplikongrößen von weniger als 270 bp ermöglicht. Dabei wird nach PCR Amplifikation die Multiplexreaktion in zwei Sets von STR Multiplexen aufgeteilt und getrennt analysiert. Dieses Multiplexsystem wurde speziell für die Verwendung in forensischer Ermittlungsarbeit entwickelt und getestet, wenn nur begrenzte Mengen oder stark degradierte DNA erhältlich ist, zum Beispiel, wenn aus Telogenhaarwurzeln isoliert. Die vorliegende Erfindung betrifft zudem ein entsprechendes Kit zur STR Typisierung.

Hintergrund der Erfindung

Für die Typisierung von Spuren und Personen werden heute fast ausschließlich Merkmale der genomischen DNA in Form sogenannter "Short Tandem Repeat" (STR)-Polymorphismen verwendet [T.R. Moretti, A.L. Baumstark, D.A. Defenbaugh, K.M. Keys, J.B. Smerick, B. Budowle, Validation of short tandem repeats (STRs) for forensic usage: performance testing of fluorescent multiplex STR Systems and analysis of authentic and simulated forensic samples, J Forensic Sci 46 (2001) 647-660]. Dabei handelt es sich um unabhängig vererbte autosomale Short Tandem Repeat-Systeme (STR-Systeme), die nach PCR-Amplifikation in Multiplex-PCR-Systemen z.B. kapillarelektrophoretisch aufgetrennt werden.

Aufgrund des Abstands der verwendeten Primer zu den sich wiederholenden Repeat Einheiten ergeben sich nach PCR-Amplifikation fest definierte Fragmentlängen. Diese liegen bei den kommerziell verwendeten Multiplex-Systemen zwischen 100 und 400 bp. Damit müssen zu typisierende DNA-Stücke mindestens dieselbe Länge haben oder größer sein [B.E. Krenke, A. Tereba, S.J. Anderson, E. Buel, S. Culhane, C.J. Finis, C.S. Tomsey, J.M. Zachetti, A. Masibay, D.R. Rabbach, E.A. Amriott, C.J. Sprecher, Validation of a 16-locus fluorescent multiplex System, J Forensic Sci 47 (2002) 773-785, E.A. Cotton, R.F. Allsop, J.L. Guest, R.R. Frazier, P.

Koumi, I.P. Callow, A. Seager, R.L. Sparkes, Validation of the AMPFISTR SGM plus system for use in forensic casework, *Forensic Sci Int* 112 (2000) 151-161].

Die Untersuchung von Minimalspuren, wie z.B. Knochenfragmenten, Fingerabdrücken und telogenen Haaren erfordert sehr effektive Typisierungsverfahren, die eine hohe Sensitivität mit der Bestimmung von möglichst vielen DNA-Merkmalen verbinden. Die Amplifikation erfolgt normalerweise unter optimierten Bedingungen bei geringsten DNA-Mengen (11 µl Probenvolumen / 34 PCR-Zyklen). Dieses Verfahren zum Nachweis von "low copy number" DNA-Molekülen muß bei derartigen biologischen Spuren angewandt werden, da hier nur minimalste Mengen menschlicher DNA zu erwarten sind. Auch kann die Amplifikation nur einmal durchgeführt werden, da die extrahierte DNA vollständig aufgebraucht wird. Aus den bisherigen Verfahren ergibt sich weiterhin, daß bei Verwendung von drei unterschiedlichen Fluoreszenzfarben als Markierungen bei der Analyse maximal fünf bis sechs STR-Systeme ohne Überlappung der PCR-Fragmente in einem Ansatz analysiert werden können.

Trotzdem führen in Fällen, in denen nur eine sehr geringe Menge von DNA erhältlich ist und/oder die Qualität der DNA aufgrund von Degradation schlecht ist, kommerzielle Multiplexkits oft zu keinen oder nur teilweisen DNA Profilen [P.M. Schneider, K. Bender, et al., STR analysis of artificially degraded DNA-results of a collaborative European exercise, *Forensic Sci Int* 139 (2004) 123-134].

Ein direkter Zusammenhang zwischen Amplifikationseffizienz und Amplikongröße wurde klar gezeigt [K. Bender, M.J. Farfan, P.M. Schneider, Preparation of degraded human DNA under controlled conditions, *Forensic Sci Int* 139 (2004) 135-140; D.T. Chung, J. Drabek, K.L. Opel, J.M. Butler, B.R. McCord, A study on the effects of degradation and template concentration on the Amplifikation efficiency of the STR Miniplex primer sets, *J Forensic Sci* 49 (2004) 733-740]. In vielen Fällen können Haare von dem Opfer oder von dem möglichen Angreifer an einer Verbrechensstelle gefunden werden, von diesen sind jedoch mehr als 90% sogenannte Telogenhaare, die keine anheftenden Haarwurzelzellen aufweisen. Mit den kommerziellen STR Kits werden gewöhnlich Amplikongrößen erzeugt, die von 100 bis 400 bp reichen. Bei der Typisierung von DNA aus Telogenhaaren wird bei größeren STR Fragmentgrößen gewöhnlich ein Verlust der Signalstärke beobachtet, aufgrund der Tatsache, daß die DNA während der Haarentwicklung in kleinere Stücke fragmentiert wurde [H. Matsuda, K. Imaizumi, S. Kubota, S. Miyasaka, M. Yoshino, S. Seta, Technical Investigation of DNA extraction from single hair

shaft., Rep Nat Res Inst Police Sci 50 (1997) 23-28]. Falls keine Haarwurzel vorhanden ist, ist nur eine Typisierung von mitochondrieller-(mt)DNA (Haarfragmente) möglich, oder es können die neuen STR Systeme für verkürzte Amplikongrößen können verwendet werden. Für diese Typisierung von schwierigen DNAs, d.h. stark degradiert DNA wie sie z.B. bei der Extraktion aus Haaren vorliegt, wurden daher in den letzten Jahren verkürzte Primer entwickelt. Dabei werden die Primer auf der DNA-Sequenz näher an die Repeat-Einheit herangerückt, so daß insgesamt kürzere DNA-Fragmente analysiert werden können. Die minimale Länge dieser Fragmente liegt bei 60 bis 250 bp [P. Grubwieser, R. Muhlmann, W. Parson, New sensitive amplification primers for the STR locus D2S1338 for degraded casework DNA, Int J Legal Med 117 (2003) 185-188; J.M. Butler, Y. Shen, B.R. McCord, The development of reduced size STR amplicons as tools for analysis of degraded DNA, J Forensic Sci 48 (2003) 1054-1064; P. Wiegand, M. Kleiber, Less is more - length reduction of STR amplicons using redesigned primers, Int J Legal Med 114 (2001) 285-287; Y. Shigeta, Y. Yamamoto, Y. Doi, S. Miyaishi, H. Ishizu, Evaluation of a method for typing the microsatellite D12S391 locus using a new primer pair and capillary electrophoresis, Acta Med Okayama 56 (2002) 229-236].

Bisher wurden entweder Einzel-PCR-Reaktionen oder kleine Multiplex-PCRs durchgeführt [J.M. Butler, Y. Shen, B.R. McCord, The development of reduced size STR amplicons as tools for analysis of degraded DNA, J Forensic Sci 48 (2003) 1054-1064; P. Wiegand, M. Kleiber, Less is more - length reduction of STR amplicons using redesigned primers, Int J Legal Med 114 (2001) 285-287].

Ein weiterer Ansatz ist die aufeinanderfolgende Amplifikation von Einzel-STR-Systemen, wobei die DNA an eine Membran gebunden ist (Festphasen-PCR) [A. Hellmann, U. Rohleder, H. Schmitter, M. Wittig, STR typing of human telogen hairs - a new approach, Int J Legal Med 114 (2001) 269-273]. Dieser Ansatz, speziell für die Typisierung von Telogenhaarwurzeln entwickelt, verwendet eine Reihe von einzelnen STR Typisierungsschritten, während die aus dem Haar extrahierte DNA während der aufeinanderfolgenden PCR Reaktionen auf einer Membran fixiert ist. Diese sogenannte Festphasen-PCR, anfänglich für drei STR Systeme publiziert, wurde jetzt bis auf sieben STR Systeme zusätzlich Amelogenin erweitert (H. Schmitter und A. Hellmann, persönliche Mitteilung). Obwohl der Test gut funktioniert, ist diese Prozedur sehr zeitintensiv und der Erfolg der Typisierung hängt stark von der Qualität der für die Bindung der DNA verwendeten Membran ab. Um diese repetitiven PCR Amplifikationsschritte zu vermeiden, wurden durch einige Arbeitsgruppen kurze PCR Multiplexe ent-

wickelt [J.M. Butler, Y. Shen, B.R. McCord, The development of reduced size STR amplicons as tools for analysis of degraded DNA, *J Forensic Sci* 48 (2003) 1054-1064; P. Wiegand, M. Kleiber, Less is more - length reduction of STR amplicons using redesigned primers, *Int J Legal Med* 114 (2001) 285-287; C. Meissner, persönliche Mitteilung]. Wie in allen kommerziellen STR Multiplexkits werden die verschiedenen STR Systeme durch ihre Amplikongrößen und den Fluoreszenzfarbstoff für den entsprechenden Locus unterschieden. Wenn die maximalen Größen der amplifizierten PCR Produkte auf ungefähr 250 bp begrenzt sind, kann zur Typisierung von hoch fragmentierter DNA nur eine kleine Zahl von STR in diesem Größenbereich angeordnet werden.

Nachteilhafterweise können somit bei der Einzel-PCR, bei Vorhandensein von minimalsten Mengen an DNA, nur ein STR System analysiert werden. Bei den kleinen Multiplexen können ebenfalls nur wenige STR Systeme analysiert werden. Meist sind darunter zu wenig in der Datenbank verwertbare Systeme vorhanden. Bei der Festphasen-PCR besteht durch die häufigen Waschschritte zudem eine erhöhte Kontaminationsgefahr, des weiteren ist die Durchführung der Analyse stark abhängig von der Qualität der verwendeten Membran.

Die Untersuchung von Minimalspuren, wie z.B. Knochenfragmenten, Fingerabdrücken und telogenen Haaren erfordert somit sehr effektive Typisierungsverfahren, die eine hohe Sensitivität mit der Bestimmung von möglichst vielen DNA-Merkmalen verbindet.

In einem ersten Aspekt davon wird diese Aufgabe der vorliegenden Erfindung durch ein Verfahren zur Typisierung eines Individuums gelöst, das die Schritte umfaßt von a) zur Verfügung stellen von genomischer DNA von dem Individuum, b) Amplifikation von mindestens zwei short tandem repeat (STR)-Loci der genomischen DNA mittels, gegebenenfalls markierten, Paaren von Amplifikations-Primern, wobei mindestens ein Primer mit einer Bindungsgruppe versehen ist, c) Auftrennung der amplifizierten STR-Fragmente mittels der Bindungsgruppe in mindestens zwei Fraktionen von Amplifikaten, und d) getrennter Nachweis der STR-Fragmente der Fraktionen.

Durch die Kombination von zwei (Multiplex)-PCR-Reaktion, die im Laufe der Analyse wieder voneinander getrennt werden, ist es möglich, eine verbesserte Qualität der STR-Analyse, insbesondere bei kleinsten Mengen an DNA, zu erzielen. Zudem ist es erstmals möglich, in einem

Ansatz mindestens 10 autosomale STR-Systeme plus dem geschlechts-spezifischen Amelogenin-System zu analysieren.

Dies wird erfindungsgemäß dadurch erreicht, daß in einer bevorzugten Ausführungsform zwei kleinere Multiplex-PCR-Reaktionen (eine 5-Plex und eine 6-Plex) gemeinsam als Multiplex-PCR amplifiziert werden. Durch die Verwendung von z.B. biotinylierten PCR-Primern bei einem der beiden kleinen Multiplexe können dessen Produkte nach erfolgter PCR nach Bindung an z.B. Streptavidin beschichtete Sepharosebeads abgetrennt werden und auf der Kapillargelelektrophorese getrennt untersucht werden. Damit würden sie die PCR-Produkte zwar im Multiplex überlappen, jedoch nicht bei der Trennung der Multiplexe und separater Kapillarelektrophorese. Der Unterschied zu den o.g. Verfahrenen ist somit die Verwendung von mit einer Bindungsgruppe versehenen (z.B. biotinylierten) PCR-Primern bei einem Subset der Multiplex-Reaktion. Dies ermöglicht die Amplifikation von sich in der Länge überlappenden PCR-Fragmenten, die ohne Trennung nicht gemeinsam auf der Kapillarelektrophorese untersucht werden könnten.

Vorteilhafterweise ermöglicht die Erfindung die Bestimmung von möglichst vielen DNA-Merkmalen auch aus geringsten DNA-Spuren in einem Ansatz. Dadurch wird zum einem möglichst wenig Spurenmaterial verwendet, um eine zweite unabhängige Analyse zu ermöglichen bzw. bei geringsten DNA-Mengen, wenn die gesamte isolierte DNA eingesetzt werden muß, überhaupt mehrere Merkmale bestimmen zu können. Im Vergleich zur sukzessiven Amplifikation mit der Festphasen-PCR nach z.B. Hellmann et al. ergibt sich zudem eine deutliche Zeitersparnis und eine deutlich geringere Kontaminationsgefahr. Im Vergleich zu anderen Multiplex-Reaktionen ist eine deutliche Steigerung in der Anzahl der untersuchbaren DNA-Merkmale möglich.

Bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Verfahren zur Typisierung eines Individuums, wobei das Individuum ein Säugetier, wie zum Beispiel ein Mensch ist.

Weiter bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Verfahren zur Typisierung eines Individuums, wobei die STR-Loci ausgewählt sind aus der Gruppe, umfassend D3S1358, D8S1179, D21S11, TH01, FGA, VWA, D2S1338, D12S391, TPOX, D5S818, D18S51, FES und Amelogenin.

Noch weiter bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Verfahren zur Typisierung eines Individuums, wobei mehr als drei, vier, fünf, sechs, sieben, acht, neun, zehn oder elf STR-Loci amplifiziert werden. Erfindungsgemäß kann die Amplifikation mittels PCR und/oder Multiplex-Amplifikation erfolgen.

Auch weiter bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Verfahren zur Typisierung eines Individuums, wobei die Primer mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind. Der Fluoreszenzfarbstoff kann jeder geeignete Farbstoff sein, insbesondere ist er ausgewählt aus der Gruppe, umfassend 6-FAM, JOE, NED und PET(rot).

Auch weiter bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Verfahren zur Typisierung eines Individuums, wobei die Bindungsgruppe ausgewählt ist aus der Gruppe, umfassend Biotin, Streptavidin, einem His-tag, hitzestabilen Antigen und Oligonukleotid. Erfindungsgemäß können alle Bindungsgruppen verwendet werden, die nicht mit der Amplifikation interferieren und sich für eine anschließende Abtrennung der Fraktionen eignen. Diese Auftrennung der amplifizierten STR-Fragmente mittels der Bindungsgruppe kann eine feste Phase umfassen, auf der z.B. Biotin, Streptavidin, Antikörper oder komplementäre Oligonukleotide immobilisiert sind. Erfindungsgemäß kann die feste Phase eine Membran, Sepharose beads oder magnetische Sepharose beads umfassen. Geeignete andere Phasen sind dem Fachmann bestens bekannt.

Bevorzugt ist dann ein erfindungsgemäßes Verfahren zur Typisierung eines Individuums, wobei die genomische DNA aus Blut, Blutbestandteilen, Spermia und/oder Telogenhaaren stammt.

Weiter bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Verfahren zur Typisierung eines Individuums, wobei der Nachweis der STR-Fragmente der Fraktionen eine Längenbestimmung der Fragmente umfaßt, zum Beispiel mittels Kapillarelektrophorese. Geeignete andere Nachweisverfahren sind dem Fachmann ebenfalls bestens bekannt.

Noch weiter bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Verfahren zur Typisierung eines Individuums, wobei als Primerpaare mindestens zwei Paare ausgewählt aus der Gruppe der SEQ ID Nrn. 1-3; 4 und 5; 6 und 7; 8 und 9; 10 und 11; 12 und 13; 14 und 15; 16 und 17; 18 und 19; 20 und 21; und 22 und 23 (siehe Tabelle 1) eingesetzt werden.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft dann ein Verfahren zur Typisierung eines Individuums, das weiterhin eine Identifizierung des Individuums anhand der nachgewiesenen STR-Fragmente umfaßt.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft dann einen diagnostischen Kit, umfassend mindestens zwei Paare von STR-Primern zur Durchführung des Verfahrens wie oben, gegebenenfalls mit weiteren Materialien und Hilfsstoffen. Entsprechende Materialien und Hilfsstoffe sind zum Beispiel PCR-Reagenzien, Puffer, feste Phasen, Gebrauchsanweisungen, Farbstoffe und anderes.

Ein letzter Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft dann die Verwendung des Verfahrens wie oben oder des Kits wie oben im Rahmen der Forensik.

Eine neue STR Typisierungsstrategie wurde entwickelt, die die gleichzeitige Amplifikation und anschließende Analyse von (z.B.) elf polymorphen Systemen mit Amplikongrößen kleiner als 270 bp ermöglicht. Die Multiplex Amplifikationsreaktion schließt sechs STR Loci aus dem europäischen Standardset von Loci (ESS) für DNA Datenbanken (D3S1358, D8S1179, D21S11, TH01, FGA und VWA), sowie vier zusätzliche STR Systeme ein, die aufgrund ihrer Robustheit ausgewählt wurden (D2S1338, D12S391, TPOX und D5S818), zusammen mit dem Geschlechts-spezifischen Locus Amelogenin. Nach der PCR Amplifikation wird die Multiplexreaktion in zwei Sets von STR Multiplexen unter der Verwendung von Biotin markierten Primern nur für ein Set aufgeteilt. Unter der Verwendung von Streptavidin-beschichteten Sepharosebeads werden z.B. fünf STR Systeme (oder auch zwischen zwei und neun) von den restlichen (z.B. sechs) Systemen abgetrennt, bevor sie in zwei verschiedenen Läufen auf einem Kapillar-Gelelektrophoreseinstrument analysiert werden. Dieses Multiplexsystem wurde speziell für die Verwendung in forensischer Ermittlungsarbeit entwickelt und getestet, wenn nur begrenzte Mengen oder stark degradierte DNA erhältlich ist, zum Beispiel, wenn aus Telo-genhaarwurzeln isoliert.

In der vorliegenden Erfindung beschreiben die Erfinder ein Verfahren worin z.B. zwei 5-plex und 6-plex PCR Reaktionen in eine große Multiplexreaktion kombiniert werden. 10 STR Systeme plus Amelogenin werden ko-amplifiziert, mit maximalen Fragmentgrößen bis zu 262 Basenpaaren (Tabelle 2), und dann in die zwei anfänglichen kleinen Multiplexreaktionen aufgeteilt. Die Primersequenzen wurden aus veröffentlichten Daten ausgewählt [P. Grubwie-

ser, R. Muhlmann, W. Parson, New sensitive Amplifikation primers for the STR locus D2S1338 for degraded casework DNA, *Int J Legal Med* 117 (2003) 185-188; Y. Shigeta, Y. Yamamoto, Y. Doi, S. Miyaishi, H. Ishizu, Evaluation of a method for typing the microsatellite D12S391 locus using a new primer pair and capillary electrophoresis, *Acta Med Okayama* 56 (2002) 229-236; J.M. Butler, Y. Shen, B.R. McCord, The development of reduced size STR amplicons as tools for analysis of degraded DNA, *J Forensic Sci* 48 (2003) 1054-1064; A. Hellmann, U. Rohleder, H. Schmitter, M. Wittig, STR typing of human telogen hairs - a new approach, *Int J Legal Med* 114 (2001) 269-273], aus einem käuflich erhältlichen Multiplexkit entnommen, sowie freundlicherweise durch Dr. Schmitter und Dr. Hellmann (Bundeskriminalamt, Wiesbaden, Germany) zur Verfügung gestellt. In diesem neuen Multiplexansatz wurden z.B. fünf von 11 STR Systemen unter der Verwendung von Biotin-markierten reversen Primern amplifiziert. Daher ist es möglich, die biotinylierten Amplikons von der Multiplex PCR, z.B. unter der Verwendung von Streptavidin-beschichteten Sepharosebeads, abzutrennen. Die zwei abgetrennten Multiplexe wurden dann jeweils auf ABI Prism 310 und/oder 3100avant Genetic Analyzern analysiert.

Der vorliegende innovative Ansatz kombiniert gleichzeitig die Multiplex-Amplifikation von z.B. elf Loci mit sehr kurzen Amplikons mit der biochemischen Auftrennung der Amplikons in z.B. zwei Fraktionen von Fragmenten für die anschließende elektrophoretische Analyse. Obwohl das z.B. Biotin Separationsverfahren ein wenig mehr Arbeit verursacht und Zeit benötigt, weist es den hauptsächlichsten Vorteil auf, daß es wertvolles Probenmaterial dadurch schont, daß es die gleichzeitige Analyse von zehn kurzen Amplikon STR Systemen aus einem einzigen DNA Aliquot erlaubt. Diese Verfahren kann in Fällen verwendet werden, wenn die meisten der herkömmlich verwendeten Multiplex STR Kits nicht in der Lage sind, verlässliche Ergebnisse zu produzieren. Der Multiplex schließt sechs der sieben europäischen STR Loci für nationale DNA Datenbanken und acht STR Loci aus der U.S. CODIS Datenbank [P.D. Martin, H. Schmitter, P.M. Schneider, A brief history of the formation of DNA databases in forensic science within Europe, *Forensic Sci Int* 119 (2001) 225-231] ein. Das hier vorgestellte sogenannte "BioPlex-11" Multiplex PCR System, mit seiner hohen Unterscheidungs(PD)-Wert von $4,21 \times 10^{12}$ für alle zehn STRs und $5,24 \times 10^7$ für die sechs europäischen Datenbanken STR Systeme, stellt ein signifikantes und sensitives System für eine schlagkräftige Analyse von degradierten und "low copy" DNA Proben zur Verfügung.

Die vorliegende Erfindung soll nun auf Basis der folgenden Beispiele unter Bezug auf die beigefügten Figuren weiter verdeutlicht werden.

In den **Figuren** zeigt:

Fig. 1. Die allelischen Leitern für das neue Bioplex-11 wurden aus den allelischen Standards der SGM Plus™ (Applied Biosystems) oder PowerPlex® 16 (Promega) Kits und der "self-assembled" D12S391 Leiter reamplifiziert. Die drei oberen Panel stellen die zwei 6-FAM-markierten STR Systeme D3S1358 und D2S1338 zusammen mit Amelogenin, die zwei JOE-markierten STR Systeme D8S1179 und D21S11, sowie das D12S391 System, das zu dem 6-plex Teil des Multiplex gehört, dar. Die drei unteren Panel zeigen die zwei 6-FAM-markierten STR Systeme TH01 und FGA, die zwei JOE-markierten STR System TPOX und VWA, sowie das D5S818 System aus dem biotinylierten 5-plex Submultiplex.

Fig. 2. Sensitivitätsuntersuchung unter der Verwendung von aufeinanderfolgenden Verdünnungen von genomischer DNA von 500 pg abwärts bis 6,25 pg. Für eine bessere Übersicht zeigt der Screenshot nur das Elektrophorogramm aus dem 5-plex Teil des Multiplex. PCR Produkte wurden aufgetrennt und auf dem ABI PRISM 310 Genetic Analyzer nachgewiesen. Pfeile zeigen Peaks, die N- und N+1 Fragmente anzeigen, die typischerweise für die Überamplifikation von DNA Proben sind.

| STR Locus | Primer | Genbank Zugangsnummer | Primersequenzen (5'-3')- SEQ ID Nr. |
|-----------|------------------------------------|---|--|
| Am | AX-F AY-F AXY-R (6-FAM) | K.M. Sullivan, A. et al., A rapid and quantitative DNA sex test: fluorescence-based PCR analysis of X-Y homologous gene amelogenin, Biotechniques 15 (1993) 636-638, 640-631. | ATC CCA GAT GTT TCT CAA GT (SEQ ID Nr. 1) ATC CCA AAT AAA GTG GTT TCT (SEQ ID Nr. 2) TCA GAG CTT AAA CTG GGA AG (SEQ ID Nr. 3) |
| D3S1358 | D3S1358vs-F (6-FAM) D3S1358vs-R | NT_005667 | AGC AAG ACC CTG TCT CAT AGA (SEQ ID Nr. 4) GTC AAC AGA GGC TTG CAT GTA (SEQ ID Nr. 5) |
| D2S1338 | D2S1338vs-F (6-FAM) D2S1338vs-R | AC010136 | <u>CCC CGC</u> AGT GGA TTT GGA AAC AGA AAT G (SEQ ID Nr. 6) <u>CCC CCT</u> CAG TAA GTT AAA GGA TTG CAG G (SEQ ID Nr. 7) |
| D8S1179 | D8S1179vs-F (JOE) D8S1179vs-R | AF216671 | TGT ATT TCA TGT GTA CAT TCG TA (SEQ ID Nr. 8) GAT TAT TTT CAC TGT GGG GA (SEQ ID Nr. 9) |
| D21S11 | D21S11vs-F (JOE) D21S11vs-R | M84567 | ATT CCC CAA GTG AAT TGC (SEQ ID Nr. 10) GGT AGA TAG ACT GGA TAG ATA GAC GA (SEQ ID Nr. 11) |
| D12S391 | D12S391vs-F (NED) D12S391vs-R | G08921 | AAC AGG ATC AAT GGA TGC AT (SEQ ID Nr. 12) CCT CTA ATA AAT CCC CTC TC (SEQ ID Nr. 13) |
| THO1 | THO1vs-F (6-FAM) THO1vs-R | D00269 | CCT GIT CCT CCC TTA TTT CC (SEQ ID Nr. 14) GAA CAC AGA CTC CAT GGT G |

| | (Bio) | | (SEQ ID Nr. 15) |
|--------|--|----------|--|
| FGA | FGAvs-F (6-FAM) FGAvs-R (Bio) | M64982 | GGC ATA TTT ACA AGC TAG TTT CT (SEQ ID Nr. 16) ATT TGT CTG TAA TTG CCA GC (SEQ ID Nr. 17) |
| TPOX | TPOXvs-F (JOE) TPOXvs-R (Bio) | M68651 | GGG AAC CCT CAC TGA ATG (SEQ ID Nr. 18) CAG CGT TTA TTT GCC CAA (SEQ ID Nr. 19) |
| VWA | VWAvs-F (JOE) VWAvs-R (Bio) | M25858 | <u>CCC CCC</u> TGA CTT GGA TTG ATC TAT CTG T (SEQ ID Nr. 20) <u>CCC CCC</u> GAT AAA TAC ATA GGA TGG ATG GA (SEQ ID Nr. 21) |
| D5S818 | D5S818vs-F (NED) D5S818vs-R (Bio) | AC008512 | GGT GAT TTT CCT CTT TGG TAT CC (SEQ ID Nr. 22) AGC CAC AGT TTA CAA CAT TTG TAT CT (SEQ ID Nr. 23) |

Tabelle 1: PCR Primersequenzen für Amelogenin und STR-Systeme. Unterstrichen sind C-Stretch-Sequenzen für die Verlängerung des PCR Produkts. Die Referenzsequenzen für die STR Marker wurden aus der GenBank® (<http://csl1.nist.gov>) erhalten.

Beispiele

DNA Extraktion. Menschliche genomische DNA wurde aus Blut und forensischen Telogenhaarproben extrahiert. Blutproben wurden mit dem E.Z.N.A. Blood DNA Kit II (peqlab Biotechnologie GmbH, Deutschland) extrahiert. Kontroll-DNA von NA3657A Zellen wurde freundlicherweise durch Dr. R. Szibor [R. Szibor, J. Edelmann, S. Hering, I. Plate, H. Wittig, L. Roewer, P. Wiegand, F. Cali, V. Romano, M. Michael, Cell line DNA typing in forensic genetics - the necessity of reliable standards, Forensic Sci Int 138 (2003) 37-43.], Institut für Rechtsmedizin, Universität Magdeburg, Deutschland zur Verfügung gestellt. Die NA9947A DNA Probe wurde aus dem PowerPlex® 16 Kit (Promega, Madison, USA) entnommen. Haarproben wurden aus früheren Fällen verwendet. DNA aus Telogenhaaren wurde wie schon

bei Hellmann et al. beschrieben wurde [A. Hellmann, U. Rohleder, H. Schmitter, M. Wittig, STR typing of human telogen hairs-a new approach, *Int J Legal Med* 114 (2001) 269-273.] extrahiert. Kurz, es wurde ungefähr ein cm eines Haarfragments, enthaltend die Telogenwurzel in 500 µl TNca Puffer verdaut. Nach Reinigung durch Standard Phenol/Chloroform Verfahren wurde die DNA mit einem Microcon-30 Mikrokonzentrator (Millipore, Eschborn, Deutschland) konzentriert. Die STR-Analyse von künstlich degradiert DNA wurde unter der Verwendung von Aliquots an DNA aus den P118 und HepG2 Zelllinien durchgeführt, die von unserer kollaborativen europäischen Übung an degradiert DNA gelagert wurden [P.M. Schneider, K. Bender, et al. STR analysis of artificially degraded DNA-results of a collaborative European exercise, *Forensic Sci Int* 139 (2004) 123-134, K. Bender, M.J. Farfan, P.M. Schneider, Preparation of degraded human DNA under controlled conditions, *Forensic Sci Int* 139 (2004) 135-140.].

PCR Amplifikation. Für die Amplifikation von sehr kurzen Tandem Repeat Systemen wurde das käuflich erhältliche Quiagen® Multiplex PCR Kit (Quiagen, Hilden, Deutschland) gemäß den Anweisungen des Herstellers mit Applied Biosystems Gene®Amp PCR System 2400/2700 Thermocyclern verwendet. Die PCR wurde in 25 µl Reaktionsvolumen durchgeführt, die 11 µl Templat-DNA, 12.5 µl Multiplex PCR Puffer [besteht aus HotStar Taq® DNA Polymerase, dNTP Mix, 6 mM MgCl₂, 10 µM jedes Primer (Tabelle 2) unter den folgenden Bedingungen durchgeführt: anfängliche Denaturierung bei 95°C für 15min, 34 Zyklen von Denaturierung bei 94°C für 30 sec, Primerannealing bei 57°C für 90 sec, Verlängerung bei 60°C für 90 sec und ein finaler Verlängerungsschritt bei 60°C für 30min.

Amplifikation von allelischen Leitern. Allelische Leitern aus den käuflich erhältlichen SGM Plus™ (Applied Biosystems) oder PowerPlex® 16 (Promega) Kits wurden als Template verwendet. Leiteraliquots aus den Kits wurden 1 in 1.000.000 verdünnt und in individuellen PCR Reaktionen amplifiziert, unter der Verwendung derselben Bedingungen wie für die Multiplex PCR beschrieben, mit der Ausnahme einer verringerten Zahl von 30 Zyklen. Um die Genauigkeit dieser Leitern zu zeigen, wurden die allelischen Bestimmungen aller Loci zwischen Proben verglichen, die mit dem SGM Plus™ und dem PowerPlex® 16 Kit und dem neuen Bioplex-11 Multiplexkit typisiert wurden. Alle Ergebnisse wurden als identisch gefunden (Fig. 1). Die allelische Leiter für D21S391 wurde aus einer Leiter reamplifiziert, die in einer vorherigen Studie verwendet wurde [W. Waiyawuth, L. Zhang, C. Rittner, P.M. Schneider, Genetic

analysis of the short tandem repeat system D12S391 in the German and three Asian populations, Forensic Sci Int 94 (1998) 25-31].

Wenn derselbe Fluoreszenzfarbstoff für mehr als einen STR Locus verwendet wurde, wurden die allelischen Leitern so aufgebaut, daß sie nicht überlappen. Zum Beispiel sind die JOE-markierten Systeme D8S1179 und D21S11 (die von jeweils 76 - 120 Basen und von 153 - 209 Basen reichen) und die 6-FAM-markierten Systeme TH01 und FGA (die von jeweils 56 - 95 Basen und von 124 - 262 Basen reichen) um ungefähr 30 Basen getrennt. Einige STR Loci sind nur durch ein paar Basenpaare getrennt, z.B. die 6-FAM-markierten Systeme D3S1358 und D2S1338 sowie die JOE-markierten Systeme TPOX und VWA. Um falsche Allelsignale für Allele außerhalb des Leiterbereichs zu verhindern, liegen die Fragmentgrößen der angrenzenden STR Systeme eine oder zwei Basen außerhalb des tetrameren Leserahmens für die Allelbestimmung. Dies wurde durch Erhöhen der Größen der Amplikons der größeren Systeme durch Hinzufügen von bis zu sechs Basen an das 5' Ende beider Primer (siehe Tabelle 2) erreicht.

| STR Locus | Allelbereiche | PCR-Fragment (bp) | Fluoreszenzfarbstoff |
|------------|---------------|-------------------|----------------------|
| Amelogenin | X, Y | 69, 75 | 6-FAM (blau) |
| D3S1358 | 12-19 | 86-114 | 6-FAM (blau) |
| D2S1338 | 15-28 | 127-179 | 6-FAM (blau) |
| D8S1179 | 8-19 | 76-120 | JOE (grün) |
| D21S11 | 24-38 | 153-209 | JOE (grün) |
| D12S391 | 15-24 | 104-140 | NED (gelb) |
| TH01* | 4-13,3 | 56-95 | 6-FAM (blau) |
| FGA* | 17-51,2 | 124-262 | 6-FAM (blau) |
| TPOX* | 6-13 | 57-85 | JOE (grün) |
| VWA* | 11-24 | 90-142 | JOE (grün) |
| D5S818* | 7-16 | 119-155 | NED (gelb) |

Tabelle 2. Allelbereiche und die entsprechenden Fragmentgrößen für Amelogenin und alle STR-Systeme; * - biotinylierter Primer.

Weiterhin, um allelische Peaks von dem anderen Multiplex im Fall von schlechter Biotin-Streptavidin Auftrennung nachzuweisen, überlappen die allelischen Leitern nicht im Hin-

blick auf ihre tetrameren Repeatgrößenzwischen den 6-plex und den 5-plex Reaktionen, wenn derselbe Fluoreszenzfarbstoff verwendet wird.

Multiplex Auftrennung und Kapillargelelektrophorese. Die biotinylierten Produkte aus der PCR Reaktion wurden auf Streptavidin-beschichtete Sepharosebeads (Streptavidin Sepharose™ HP, Amersham Biosciences Ltd.) immobilisiert. Kurz, es wurden drei Mikroliter Sepharosebeads-Lösung mit 20 µl PCR Produkten, Bindungspuffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,6; 2 M NaCl; 1 mM EDTA, pH 8,0; 0.1 % Tween 20) und Wasser in einem finalen Volumen von 80 µl gemischt. Das Gemisch wurde für 15 Minuten bei Raumtemperatur unter kontinuierlichem Mischen auf einer Schüttelvorrichtung (2000 U/min) inkubiert. Nach Immobilisierung wurden die Beads abzentrifugiert, der Überstand wurde weiter mit dem MSB Spin PCRapace Kit (Invitex GmbH, Deutschland) gemäß den Anweisungen des Herstellers gereinigt, und die PCR Produkte wurden zuletzt in 20 µl Elutionspuffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,0) gesammelt. Auf Sepharosebeads immobilisierte PCR Produkte wurden zweimal gewaschen, zuerst mit 150 µl Waschpuffer (10 mM Tris-Acetat, pH 7,6) und dann mit dem selben Volumen an 70 % Ethanol. Zuletzt wurden die Beads in 20 µl Elutionspuffer aus dem MSB Spin PCRapace Kit resuspendiert. Fünf Mikroliter jeder gereinigten PCR Fraktion wurden mit 25 µl Formamid, enthaltend 1,2 µl internen Spur Standard 600 (ILS600, Promega), gemischt und durch Kapillargelelektrophorese (unter der Verwendung von POP-6 Polymer) in an ABI PRISM 310 oder 3100avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) aufgetrennt.

Spezifität und Reproduzierbarkeit. Um die Spezifität des neuen STR Multiplex zu überprüfen, wurden 66 pg von nicht-degradierter menschlicher DNA aus 15 Blutproben mindestens zweimal amplifiziert, aufgetrennt und durch Kapillargelelektrophorese analysiert. Die Ergebnisse wurden mit den Typisierungen mit den SGM Plus™ (Applied Biosystems) oder PowerPlex® 16 (Promega) Kits und der einzelnen Amplifikation des D12S391 STR Systems verglichen [W. Waiyawuth, L. Zhang, C. Rittner, P.M. Schneider, Genetic analysis of the short tandem repeat system D12S391 in the German and three Asian populations, Forensic Sci Int 94 (1998) 25-31]. Der Erfinder beobachtete nur 0,4 % Ausfall-Allele und kein extra Allele unter allen analysierten Proben. Mittels Typisierung von 100 pg an genomischer DNA wurden alle Allele richtig angezeigt. Nach Auftrennung und Reinigung der zwei Multiplexe wurde eine Kreuzkontamination zwischen den zwei kleinen Multiplexen nie beobachtet.

Empfindlichkeit und Degradationsuntersuchung. Für die Validierung der Test-Empfindlichkeit wurden Proben erfolgreich bis herunter zu 25 pg DNA typisiert, dem Äquivalent von ungefähr vier Zellkernen, verglichen mit Standard Amplifikation mit 100 pg an DNA (Fig. 2). Die Verwendung von DNA Mengen größer als 100 pg führte oft zu N- und N+1 Fragmente, die typischerweise im Fall von Überamplifikation gefunden werden [R. Sparkes, C. Kimpton, S. Gilbard, P. Came, J. Andersen, N. Oldroyd, D. Thomas, A. Urquhart, P. Gill, The validation of a 7-locus multiplex STR test for use in forensic casework. (II), Artefacts, case-work studies and success rates, *Int J Legal Med* 109 (1996)195-204]. Sogar mit 25 pg menschlicher DNA wurden nur wenige "Ausfall-Allele" beobachtet. Mit einer niedrigeren DNA Konzentration stieg das Risiko für Ausfall-Allele dramatisch. Die Ausfälle begannen bei 50 pg aufzutreten, und nahmen drastisch zu bei 12,5 pg. "Drop in"-Allele wurden nicht beobachtet. Diese Ausfälle spiegeln stochastische Effekte wider, wenn extrem geringe DNA Mengen für die Amplifikation verwendet werden.

Um die Amplifikationseffizienz für stark degradierte DNA zu untersuchen, haben die Erfinder DNA analysiert, die vorher für ihre Untersuchung an degradierter DNA präpariert wurde [P.M. Schneider, K. Bender, et al. STR analysis of artificially degraded DNA-results of a collaborative European exercise, *Forensic Sci Int* 139 (2004) 123-134, K. Bender, M.J. Farfan, P.M. Schneider, Preparation of degraded human DNA under controlled conditions, *Forensic Sci Int* 139 (2004) 135-140]. Die künstlich degradierte DNA aus den zwei humanen Zelllinien HepG2 und P118 wurde mit dem neuen Multiplex typisiert. Eine erfolgreiche Amplifikation mittels käuflich erhältlicher STR Multiplex Kits wurde nur für Fragmente bis ca. 220 bp erhalten. Keine oder nur schlechte Ergebnisse wurden für die längeren Systeme, wie D2S1338 und FGA erhalten. Dagegen wurden korrekte Genotypen für alle getesteten Proben mittels dem Bio-plex-11 erhalten.

Fälle und heterozygote Peakbalance. Um den neuen Multiplextest in praktischerer Arbeit zu testen, haben die Erfinder Telogenhaare aus realen Ermittlungen analysiert. Nach Multiplex STR Typisierung wurden Loci mit heterozygoten Genotypen untersucht, um die Peakbalance, Ausfall-Allele und andere Artefakte zu untersuchen. Die Typisierung von 104 Telogenhaarproben aus Ermittlungs-Untersuchungen führte zu 68 vollen DNA Profilen, 23 partiellen Profilen und in 13 Fällen keinen Amplifikationsergebnissen. Aus den erfolgreich analysierten Haarproben wurde die Zahl von Ausfällen und extra-Allelen aus einer Gesamtzahl von 1224 typisierten Allelen mit jeweils 4,8 % und 8,7 % berechnet. Die Peakbalance für jedes het-

erozygote STR System wurde gemäß Whitaker und Gill [J.P. Whitaker, E.A. Cotton, P. Gill, A comparison of the characteristics of profiles produced mit the AMPF1STR SGM Plus multiplex system for both standard and low copy number (LCN) STR DNA analysis, Forensic Sci Int 123 (2001) 215-223] berechnet und ist in Tabelle 3 zusammengefaßt. Die höchste Peakimbalance wurde für D2S1338 und FGA gefunden, den STR Systemen mit den größten Amplifikationsprodukten, und konnte manchmal nur schwer von Stotter-Peaks unterschieden werden. Das durchschnittliche Peakhöhen Verhältnis für alle Loci war 0,91.

| Locus | Min. | Mittel | Max. | SD |
|------------|------|--------|------|------|
| Amelogenin | 0,5 | 0,9 | 1,17 | 0,18 |
| D3S1358 | 0,36 | 0,78 | 0,96 | 0,36 |
| D2S1338 | 0,18 | 0,99 | 4,5 | 0,91 |
| D8S1179 | 0,69 | 1,18 | 2,1 | 0,63 |
| D21S11 | 1,04 | 1,14 | 1,24 | 0,14 |
| D12S391 | 0,13 | 0,49 | 0,69 | 0,31 |
| THO1* | 0,56 | 1,03 | 1,89 | 0,26 |
| FGA* | 0,24 | 1,08 | 3,65 | 0,95 |
| TPOX* | 0,25 | 0,75 | 0,97 | 0,16 |
| VWA* | 0,23 | 0,86 | 1,83 | 0,38 |
| D5S818* | 0,52 | 0,77 | 1,05 | 0,24 |

Tabelle 3: Heterozygote Balancen für alle STR Loci in Haarproben (n= 104)

Patentansprüche

1. Verfahren zur Typisierung eines Individuums, umfassend die Schritte von
 - a) zur Verfügung stellen von genomischer DNA von dem Individuum,
 - b) Amplifikation von mindestens zwei short tandem repeat (STR)-Loci der genomischen DNA mittels, gegebenenfalls markierten, Paaren von Amplifikations-Primern, wobei mindestens ein Primer mit einer Bindungsgruppe versehen ist,
 - c) Auftrennung der amplifizierten STR-Fragmente mittels der Bindungsgruppe in mindestens zwei Fraktionen von Amplifikaten, und
 - d) getrennter Nachweis der STR-Fragmente der Fraktionen.
2. Verfahren zur Typisierung eines Individuums nach Anspruch 1, wobei das Individuum ein Säugetier, wie zum Beispiel ein Mensch ist.
3. Verfahren zur Typisierung eines Individuums nach Anspruch 1 oder 2, wobei die STR-Loci ausgewählt sind aus der Gruppe, umfassend D3S1358, D8S1179, D21S11, TH01, FGA, VWA, D2S1338, D12S391, TPOX, D5S818, D18S51, FES und Amelogenin.
4. Verfahren zur Typisierung eines Individuums nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei mehr als drei, vier, fünf, sechs, sieben, acht, neun, zehn oder elf STR-Loci amplifiziert werden.
5. Verfahren zur Typisierung eines Individuums nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Amplifikation mittels PCR und/oder Multiplex-Amplifikation erfolgt.
6. Verfahren zur Typisierung eines Individuums nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die Primer mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind.
7. Verfahren zur Typisierung eines Individuums nach Anspruch 6, wobei der Fluoreszenzfarbstoff ausgewählt ist aus der Gruppe, umfassend 6-FAM, JOE, NED und PET(rot).

8. Verfahren zur Typisierung eines Individuums nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei die Bindungsgruppe ausgewählt ist aus der Gruppe, umfassend Biotin, Streptavidin, einem His-tag, hitzestabilen Antigen und Oligonukleotid.
9. Verfahren zur Typisierung eines Individuums nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die genomische DNA aus Blut, Blutbestandteilen, Sperma und/oder Telogenhaaren stammt.
10. Verfahren zur Typisierung eines Individuums nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei die Auftrennung der amplifizierten STR-Fragmente mittels der Bindungsgruppe eine feste Phase umfaßt, auf die Biotin, Streptavidin, Antikörper(n) oder komplementären Oligonukleotiden immobilisiert sind.
11. Verfahren zur Typisierung eines Individuums nach Anspruch 10, wobei die feste Phase eine Membran, Sepharose beads oder magnetische Sepharose beads umfaßt.
12. Verfahren zur Typisierung eines Individuums nach einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei der Nachweis der STR-Fragmente der Fraktionen eine Längenbestimmung der Fragmente umfaßt, zum Beispiel mittels Kapillargelelektrophorese.
13. Verfahren zur Typisierung eines Individuums nach einem der Ansprüche 1 bis 11, weiterhin umfassend eine Identifizierung des Individuums anhand der nachgewiesenen STR-Fragmente.
14. Verfahren zur Typisierung eines Individuums nach einem der Ansprüche 1 bis 13, wobei als Primerpaare mindestens zwei Paare ausgewählt aus der Gruppe der SEQ ID Nrn. 1-3; 4 und 5; 6 und 7; 8 und 9; 10 und 11; 12 und 13; 14 und 15; 16 und 17; 18 und 19; 20 und 21; und 22 und 23 eingesetzt werden.
15. Diagnostischer Kit, umfassend mindestens zwei Paare von STR-Primern zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 14, gegebenenfalls mit weiteren Materialien und Hilfsstoffen.
16. Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 14 oder des Kits nach Anspruch 15 im Rahmen der Forensik.

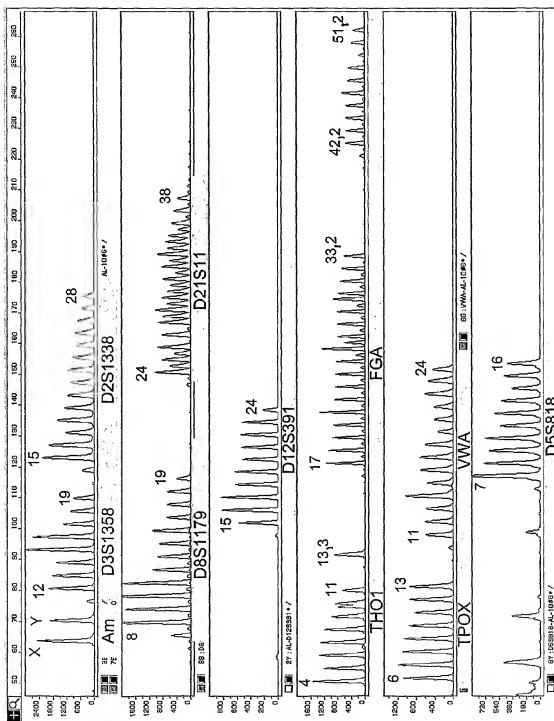


Fig. 1

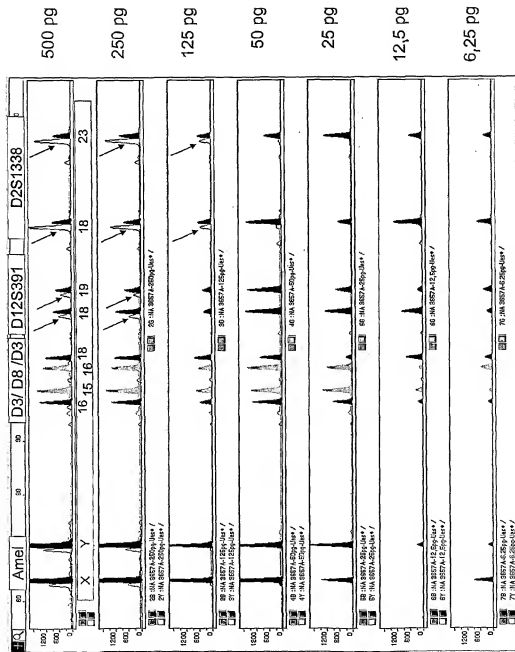


Fig. 2

SEQUENCE LISTING

<110> Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

<120> Verfahren zur Typisierung eines Individuums mittels short tandem repeat (STR)-Loci der genomischen DNA

<130> U30112PCT

<160> 23

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Human

<400> 1
atcccgatg tttctcaagt 20

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Human

<400> 2
atcccaata aagtggtttc t 21

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Human

<400> 3
tcagagctta aactgggaag 20

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Human

<400> 4
agcaagaccc tgtctcatag a 21

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Human

<400> 5
gtcaacagag gcttgcattg a 21

<210> 6

<211> 28

<212> DNA

<213> Human

<400> 6
ccccgcagtg gatttggaaa cagaaatg 28

<210> 7
<211> 28
<212> DNA
<213> Human

<400> 7
ccccctcagt aagttaagg attgcagg 28

<210> 8
<211> 23
<212> DNA
<213> Human

<400> 8
tgtatttcoat gtgtacattc gta 23

<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> Human

<400> 9
gattattttc actgtgggga 20

<210> 10
<211> 18
<212> DNA
<213> Human

<400> 10
attccccaag tgaattgc 18

<210> 11
<211> 26
<212> DNA
<213> Human

<400> 11
ggtagataga ctggatagat agacga 26

<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> Human

<400> 12
aacaggatca atggatgcac 20

<210> 13
<211> 20
<212> DNA
<213> Human

<400> 13
cctctaataa atccccctctc 20

<210> 14
<211> 20
<212> DNA
<213> Human

<400> 14
cctgttcctc ccttatttcc 20

<210> 15
<211> 19
<212> DNA
<213> Human

<400> 15
gaacacagac tccatgggtg 19

<210> 16
<211> 23
<212> DNA
<213> Human

<400> 16
ggcatatttta caagctagtt tct 23

<210> 17
<211> 20
<212> DNA
<213> Human

<400> 17
atttgtctgt aattgccagc 20

<210> 18
<211> 18
<212> DNA
<213> Human

<400> 18
gggaaccctc actgaatg 18

<210> 19
<211> 18
<212> DNA
<213> Human

<400> 19
cagcgtttat ttgcccaa 18

<210> 20
<211> 28
<212> DNA
<213> Human

<400> 20
ccccctgac ttggattgat ctatctgt 28

<210> 21
<211> 29
<212> DNA
<213> Human

<400> 21
ccccccgata aatacatagg atggatgga 29

<210> 22
<211> 23
<212> DNA
<213> Human

<400> 22
ggtgattttc ctctttgga tcc 23

<210> 23
<211> 26
<212> DNA
<213> Human

<400> 23
agccacagtt tacaacattt gtatct 26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2006/001701

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| X | BUTLER JOHN M ET AL: "The development of reduced size STR amplicons as tools for analysis of degraded DNA." JOURNAL OF FORENSIC SCIENCES. SEP 2003, vol. 48, no. 5, September 2003 (2003-09), pages 1054-1064, XP008065803 ISSN: 0022-1198 cited in the application the whole document ----- -/- | 1-16 |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *C* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *X* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 June 2006

Date of mailing of the international search report

13/07/2006

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Cornelis, K

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2006/001701

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| X | BARBER M D ET AL: "SEQUENCE ANALYSIS AND ALLELIC DESIGNATION OF THE TWO SHORT TANDEM REPEAT LOCI D18S51 AND D8S1179" INTERNATIONAL JOURNAL OF LEGAL MEDICINE, SPRINGER VERLAG, DE, vol. 109, no. 2, 1996, pages 62-65, XP001104964 ISSN: 0937-9827 the whole document | 15 |
| X | JUNGE A ET AL: "Validation studies and characterization of variant alleles at the short tandem repeat locus D12S391." INTERNATIONAL JOURNAL OF LEGAL MEDICINE. 1999, vol. 112, no. 1, 1999, pages 67-69, XP002387450 ISSN: 0937-9827 the whole document | 15 |
| X | SCHILZ FELIX ET AL: "Design of a multiplex PCR for genotyping 16 short tandem repeats in degraded DNA samples" ANTHROPOLOGISCHER ANZEIGER, vol. 62, no. 4, December 2004 (2004-12), pages 369-378, XP008065922 ISSN: 0003-5548 the whole document | 1-16 |
| A | US 2002/015962 A1 (NOLAN JOHN P ET AL) 7 February 2002 (2002-02-07) the whole document | 1-16 |
| P,X | BENDER AND SCHNEIDER: "Validation and casework testing of the bioplex-11 for STR typing of telogen hair roots" FORENSIC SCIENCE INTERNATIONAL, November 2005 (2005-11), XP002387451 Retrieved from the Internet: URL: http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2005.10.024 the whole document | 1-16 |
| P,X | WO 2005/054515 A (APPLERA CORPORATION; DIMSOSKI, PERO; WOO, SAM LEE) 16 June 2005 (2005-06-16) the whole document | 1-11 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2006/001701

| Patent document cited in search report | | Publication date | Patent family member(s) | | Publication date |
|---|----|---------------------|----------------------------|---------------|---------------------|
| US 2002015962 | A1 | 07-02-2002 | US | 6287766 B1 | 11-09-2001 |
| WO 2005054515 | A | 16-06-2005 | US | 2005112591 A1 | 26-05-2005 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2006/001701

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
INV. C12Q1/68

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
C12Q

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|-----------|--|--------------------|
| X | BUTLER JOHN M ET AL: "The development of reduced size STR amplicons as tools for analysis of degraded DNA." JOURNAL OF FORENSIC SCIENCES. SEP 2003, Bd. 48, Nr. 5, September 2003 (2003-09), Seiten 1054-1064, XP008065803 ISSN: 0022-1198 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ----- -/- | 1-16 |



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert,

aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung befragt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

I Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nützlich ist

S Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

28. Juni 2006

Abendedatum des internationalen Recherchenberichts

13/07/2006

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5018 Patentlaan 2
NL - 2260 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Beediensleier

Cornelis, K

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Batr. Anspruch Nr. |
|-----------|--|--------------------|
| X | BARBER M D ET AL: "SEQUENCE ANALYSIS AND ALLELIC DESIGNATION OF THE TWO SHORT TANDEM REPEAT LOCI D18S51 AND D8S1179" INTERNATIONAL JOURNAL OF LEGAL MEDICINE, SPRINGER VERLAG, DE, Bd. 109, Nr. 2, 1996, Seiten 62-65, XP001104964 ISSN: 0937-9827 das ganze Dokument | 15 |
| X | JUNGE A ET AL: "Validation studies and characterization of variant alleles at the short tandem repeat locus D12S391." INTERNATIONAL JOURNAL OF LEGAL MEDICINE. 1999, Bd. 112, Nr. 1, 1999, Seiten 67-69, XP002387450 ISSN: 0937-9827 das ganze Dokument | 15 |
| X | SCHILZ FELIX ET AL: "Design of a multiplex PCR for genotyping 16 short tandem repeats in degraded DNA samples" ANTHROPOLOGISCHER ANZEIGER, Bd. 62, Nr. 4, Dezember 2004 (2004-12), Seiten 369-378, XP008065922 ISSN: 0003-5548 das ganze Dokument | 1-16 |
| A | US 2002/015962 A1 (NOLAN JOHN P ET AL) 7. Februar 2002 (2002-02-07) das ganze Dokument | 1-16 |
| P,X | BENDER AND SCHNEIDER: "Validation and casework testing of the bioplex-11 for STR typing of telogen hair roots" FORENSIC SCIENCE INTERNATIONAL, November 2005 (2005-11), XP002387451 Gefunden im Internet: URL: http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2005.10.024 das ganze Dokument | 1-16 |
| P,X | WO 2005/054515 A (APPLERA CORPORATION; DIMSOSKI, PERO; WOO, SAM LEE) 16. Juni 2005 (2005-06-16) das ganze Dokument | 1-11 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2006/001701

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | Datum der Veröffentlichung |
|--|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| US 2002015962 A1 | 07-02-2002 | US 6287766 B1 | 11-09-2001 |
| WO 2005054515 A | 16-06-2005 | US 2005112591 A1 | 26-05-2005 |